

Gebrauchsanleitung

Epi proColon 2.0 CE

Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001)

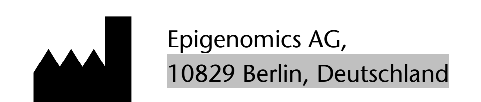
Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002)

Epi proColon Control Kit (M5-02-003)

Bitte diese Gebrauchsanleitung vor Gebrauch des Tests aufmerksam lesen und genauestens befolgen, um die Zuverlässigkeit der Testergebnisse sicher zu stellen.

IFU 0009DE, rev 5, copyright©, Oktober 2014, Epigenomics AG

REF M5-02-001, M5-02-002, M5-02-003



Epigenomics AG,
10829 Berlin, Deutschland



Inhaltsverzeichnis

1. Name und Verwendungszweck

Epi proColon 2.0 CE ist ein qualitativer Test für den real-time PCR basierten Nachweis von methylierter Septin9 DNA in bisulfit-konvertierter DNA aus humanen Plasmaproben. Vorhandensein von methyliertem Septin9 und das Vorhandensein eines kolorektalen Karzinoms korrelieren miteinander, und Septin9 kann zur Unterstützung der Diagnose dieses Karzinoms hinzugezogen werden.

Epi proColon 2.0 CE besteht aus dem Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), dem Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) und dem Epi proColon Control Kit (M5-02-003).

2. Zusammenfassung und Erläuterung des Testverfahrens

Epi proColon 2.0 CE ist ein *in vitro* Test für den qualitativen Nachweis von methylierter Septin9 DNA aus 3,5 ml Patientenplasma, basierend auf der Polymerasekettenreaktion (PCR). Cytosine der v2 Region des Septin9 Gens sind im Gewebe von Kolorektalkarzinomen (KRK), aber nicht in gesunder Darmmukosa methyliert. Diese anomale Methylierung kann durch die spezifische Vervielfältigung der DNA, die aus Tumorzellen in den Blutstrom gelangt, nachgewiesen werden. Der erfolgreiche Nachweis von KRK-DNA im Plasma mit Hilfe des Biomarkers Septin9 wurde in mehreren unabhängigen Fall-Kontroll-Studien mit KRK-Patienten und Kolonoskopie-negativen Kontrollgruppen erbracht[1-3]. Der blutbasierte Epi proColon 2.0 CE Test bietet Patienten, die eine Vorsorgekoloskopie vermeiden wollen, eine sinnvolle nicht-invasive Option zum Darmkrebs-Screening.

3. Technologische Grundlagen des Testverfahrens

Der Epi proColon 2.0 CE Test umfasst zwei Schritte. Im ersten Schritt, der mit Hilfe des Epi proColon Plasma Quick Kits (M5-02-001) durchgeführt wird, wird die DNA aus dem Plasma isoliert und anschließend in einer Bisulfitreaktion konvertiert. Im zweiten Schritt wird die in der Bisulfitreaktion konvertierte DNA (bisDNA) in einer real-time (Echtzeit) Duplex-Polymerasekettenreaktion (PCR) mit dem Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002) analysiert. Dabei werden gleichzeitig die methylierte Septin9 Ziel-DNA und eine interne Kontrolle, die ACTB (ß-Aktin) DNA, gemessen. Mit Hilfe der ACTB DNA Messung wird überprüft, ob die Menge an Gesamt-DNA ausreichend ist. Der Epi proColon Control Kit (M5-02-003) enthält Kontrollen, die als Positiv- und Negativ-Kontrolle für jeden Lauf erforderlich sind.

Die Extraktion genomischer DNA aus Patientenplasma basiert auf der Bindung freizirkulierender genomischer DNA an Magnetpartikel, die anschließend durch einen Magneten vom Plasma getrennt werden. Verbleibende Verunreinigungen werden durch Waschschritte von den Magnetpartikeln entfernt. Bei der Elution wird die gereinigte DNA von den Magnetpartikeln im Elutionspuffer gelöst. Die genomische DNA im Eluat wird anschließend mit Bisulfit behandelt. Bei dieser Behandlung werden nicht-methylierte Cytosine in der DNA spezifisch verändert. Die Bisulfitreaktion ist die Methode der Wahl, um die DNA-Methylierung zu untersuchen. Die Umwandlung basiert auf der nukleophilen Addition eines Sulfitions an ein Cytosin und einer anschließenden Desaminierungsreaktion, wobei Uracilsulfonat entsteht, während 5-Methylcytosin (methyliertes Cytosin) nicht desaminiert wird und somit unverändert bleibt.

Die Blocker und Detektionssonden, die in einer nachfolgenden PCR eingesetzt werden, erkennen diese Basenänderungen und unterscheiden zwischen methylierten und nicht-methylierten Sequenzen. Mit dem Epi proColon 2.0 CE Test wird die an den CpG Positionen methylierte bisDNA Sequenz der v2 Region des Septin9 Gens und die Gesamt-bisDNA einer Region des ACTB Gens nachgewiesen. Der Septin9 Anteil der Duplex-PCR besteht aus einem Primerpaar, das sich an zwei CpG-Dinukleotid-freie Regionen anlagert. Ein Blocker wird zugefügt, der spezifisch bisulfit-konvertierte unmethylierte Sequenzen innerhalb der Region erkennt und deren Amplifikation blockiert, so dass methylierte Sequenzen bevorzugt amplifiziert werden. In der Reaktion wird eine methylierungsspezifische Septin9-Fluoreszenzsonde zur Detektion eingesetzt, um ausschließlich methylierte Sequenzen nachzuweisen, die während der PCR amplifiziert wurden[4].

4. Im Kit Enthaltene Reagenzien

4.1. Inhalt

Tabelle 1: Inhalt des Epi proColon Plasma Quick Kits.

Reagenz	Behälter	Volumen	Lagerungstemperatur
Epi proColon Lysis Binding Buffer	1 Flasche	125 ml	15°C bis 30°C
Epi proColon Wash A Concentrate	1 Flasche	60 ml	15°C bis 30°C
Epi proColon Magnetic Beads	1 Flasche	4 ml	15°C bis 30°C
Epi proColon Wash B Concentrate	1 Flasche	7 ml	15°C bis 30°C
Epi proColon Elution Buffer	1 Röhrchen	6 ml	15°C bis 30°C
Epi proColon Bisulfite Solution	4 Flaschen	Je 1,9 ml	15°C bis 30°C
Epi proColon Protection Buffer	1 Röhrchen	1 ml	15°C bis 30°C

Tabelle 2: Inhalt des Epi proColon Sensitive PCR Kits.

Reagenz	Behälter	Volumen	Lagerungstemperatur
Epi proColon PCR Mix	2 Röhrchen	Je 810 µl	-25°C bis -15°C
Epi proColon Polymerase	1 Röhrchen	85 µl	-25°C bis -15°C

Tabelle 3: Inhalt des Epi proColon Control Kits.

Reagenz	Behälter	Volumen	Lagerungstemperatur
Epi proColon Negative Control	6 Röhrchen	Je 3,65 ml	-25°C bis -15°C
Epi proColon Positive Control	6 Röhrchen	Je 3,65 ml	-25°C bis -15°C

4.2. Warnhinweise

Bei der Arbeit mit Chemikalien müssen immer ein Laborkittel und Einmalhandschuhe getragen werden. Zur Reinigung kontaminierter Oberflächen bitte Wasser benutzen. Weitere Informationen finden Sie in den entsprechenden Sicherheitsdatenblättern (MSDS) auf unserer Webseite (http://www.epiprocolon.com/de/labore/der-septin9-test/sicherheitsdatenblaetter.html).

Epi proColon Lysis Binding Buffer und **Epi proColon Wash A Concentrate** enthalten TRITON X-100 und Guanidiniumthiocyanat
H-Sätze/ Gefahrenhinweise: EUH032: Entwickelt bei Berührung mit Säure sehr giftige Gase; H302: Gesundheitsschädlich bei Verschlucken; H312: Gesundheitsschädlich bei Hautkontakt; H318: Verursacht schwere Augenschäden; H332: Gesundheitsschädlich bei Einatmen; H412: Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.
P-Sätze/ Sicherheitshinweise: P261: Einatmen von Aerosol vermeiden; P273: Freisetzung in die Umwelt vermeiden; P301 + P312: BEI VERSCHLUCKEN: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen; P302 + P352: BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen; P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.





Epi proColon Bisulfite Solution enthält wässrige Ammoniumbisulfit Lösung **H-Sätze/ Gefahrenhinweise:** EUH031: Entwickelt bei Berührung mit Säure giftige Gase; H314: Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. **P-Sätze/ Sicherheitshinweise:** P264: Nach Gebrauch Hände gründlich waschen; P271: Nur im Freien oder in gut belüfteten Räumen verwenden; P280: Schutzhandschuhe/ Schutzkleidung tragen; P305+351+338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen; P312: Bei Unwohlsein GIFTINFORMATIONSZENTRUM oder Arzt anrufen.	 GEFAHR	
Epi proColon Protection Buffer enthält 6-Hydroxy-2,5,7,8-Tetramethylchroman-2-Carboxylsäure, Tetrahydrofurfurylalkohol **H-Sätze/ Gefahrenhinweise:** H319: Verursacht schwere Augenreizung. **P-Sätze/ Sicherheitshinweise:** P305 + P351 + P338: BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen.	 ACHTUNG	

Epi proColon Wash B Concentrate, Epi proColon Elution Buffer, Epi proColon Magnetic Beads, Epi proColon PCR Mix, Epi proColon Polymerase, Epi proColon Positive Control, und Epi proColon Negative Control sind nicht gesundheitsschädlich.

5. Lagerung und Stabilität

Alle Reagenzien des Epi proColon Plasma Quick Kits (M5-02-001), des Epi proColon Sensitive PCR Kits (M5-02-002) und des Epi proColon Control Kits (M5-02-003) sind bis zum angegebenen Verfallsdatum haltbar, wenn sie laut Anweisung gelagert und gehandhabt werden. Verwenden Sie kein Material nach Ablauf des Verfallsdatums. Mischen Sie keine Komponenten von unterschiedlichen Kit Lots.

5.1. Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001)

30 °C
15 °C

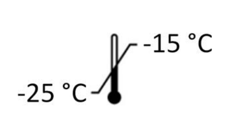
Lagern Sie alle Reagenzien des Epi proColon Plasma Quick Kits bei 15 bis 30 °C.

Epi proColon Bisulfite Solution reagiert mit dem Luftsauerstoff. Verwenden Sie nur ungeöffnete Fläschchen der Epi proColon Bisulfite Solution. Entsorgen Sie gebrauchte Lösungen!

Lagern Sie die Gebrauchslösungen des Epi proColon Wash A Buffer und des Epi proColon Wash B Buffer bei 15 bis 30 °C bis zu 6 Wochen.

Nach der ersten Benutzung sind die Reagenzien bis zu 6 Wochen bei 15 bis 30 °C haltbar.

5.2. Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002)



Lagern Sie den Epi proColon PCR Mix und die Epi proColon Polymerase bei -25 bis -15 °C.

Jedes Epi proColon PCR Mix Röhrchen kann einmal aufgetaut und wieder eingefroren werden. Nach der ersten Benutzung sind die Reagenzien bis zu 6 Wochen bei -25 bis -15 °C haltbar.

5.3. Epi proColon Control Kit (M5-02-003)

-15 °C
-25 °C

Lagern Sie den Epi proColon Control Kit bei -25 bis -15 °C.

6. Benötigte, aber nicht mitgelieferte Instrumente, Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

6.1. Allgemeine Laborausstattung

Die folgende Laborausstattung wird benötigt, um den Epi proColon 2.0 CE Test durchzuführen. Alle Laborgeräte müssen entsprechend der Herstellerangaben installiert, kalibriert, gehandhabt und gewartet werden.

Benötigte Ausstattung	Empfehlungen
Rack für 15 ml Zentrifugenröhrchen und 2 ml Reaktionsgefäße	VWR International, Katalog-Nr. 211-0200, oder gleichwertig
Rotationsmischer	VWR International, Katalog-Nr. 445-2102; Carl Roth GmbH + Co. KG, Katalog-Nr. Y549.1, oder gleichwertig
Vortex	VWR International, Katalog-Nr. 444-1372, oder gleichwertig
Thermoshaker für 2 ml Reaktionsgefäße	ThermoMixer® C, Eppendorf, Katalog-Nr. 5382 000.015, mit 2ml Trockenheizblock Eppendorf, Katalog-Nr. 5362 000.035, oder gleichwertig
Referenzpipette mit veränderbarem Volumen in folgenden Bereichen 10-100 µl, 100-1000 µl	Eppendorf Reference®, Pipette mit veränderbarem Volumen, Eppendorf, Katalog-Nr. 4910 000.042 und 4910 000.069, oder gleichwertig
Repeat Pipettor für die wiederholte Abgabe von veränderbaren Volumina	Eppendorf Multipette® M4, Eppendorf, Katalog-Nr. 4982 000.012, oder HandyStep® electronic, Brand, Katalog-Nr. 705000/705001, oder gleichwertig
Tischzentrifuge mit einem Rotor für 1,5/2,0 ml Reaktionsgefäße	Centrifuge 5418, Eppendorf, Katalog Nr. 5418 000.017 mit Rotor F-45-30-11, Eppendorf, Katalog-Nr. 5490 015.002, oder gleichwertig
Mehrkanalpipette	Eppendorf Research® plus 8-Kanal, 10–100 µl, Eppendorf, Katalog-Nr. 3122 000.035, oder gleichwertig
Plattenzentrifuge für PCR-Platten	Centrifuge 5804 R, Eppendorf, Katalog-Nr. 5804 000.013, mit Rotor A-2-DWP, Eppendorf, Katalog-Nr. 5804 740.009, oder gleichwertig
100 ml Messzylinder oder 50 ml serologische Pipette	Carl Roth, Katalog-Nr. C177.2, oder gleichwertig, oder Fischer Scientific, Katalog Nr. 11889181, oder gleichwertig

6.2. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	Empfehlungen
Absolutes Ethanol (für die Molekularbiologie, 99.5 %)	Merck KGaA, Katalog-Nr. 1.08543.0250, oder gleichwertig
15 ml Polypropylen-Zentrifugenröhrchen mit konischem Boden, PP/steril	Sarstedt, Katalog-Nr. 62.554.502, oder gleichwertig
2,0 ml Reaktionsgefäße mit rundem Boden und Sicherheitsdeckel (PP)	Sarstedt SafeSeal, Katalog-Nr. 72.695.400 oder Eppendorf Safe-LockTM, Katalog-Nr. 0030 120.094, oder gleichwertig
Pipettenspitzen mit Filter	ep Dualfilter T.I.P.S®, Eppendorf ▪ 2 – 100 µl, Katalog-Nr. 0030 077.547, oder gleichwertig ▪ 50 – 1000 µl, Katalog Nr. 0030 077.571, oder gleichwertig
Spitzen für repetitive Pipetten für folgende Volumina 0,5 ml, 1 ml, 10 ml, 25 ml	Combitips advanced®, Eppendorf: ▪ 0,5 ml, Katalog-Nr. 0030 089.421 oder gleichwertig ▪ 1 ml, Katalog-Nr. 0030 089.430 oder gleichwertig ▪ 10 ml, Katalog-Nr. 0030 089.464 oder gleichwertig ▪ 25 ml, Katalog-Nr. 0030 089.472 oder gleichwertig
Einmaltransferpipetten, nicht steril, lose, 15 cm Länge, 5 mm Halsdurchmesser, 5 ml Saugvolumen	VWR Transferpipette mit Graduierung, nicht steril, Katalog-Nr. 612-4520, oder gleichwertig

Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	Empfehlungen
Einmaltransferpipetten, nicht steril, lose, 22,5 cm Länge, 5 mm Halsdurchmesser, 5 ml Saugvolumen	Carl Roth, Katalog-Nr. EA61.1, oder gleichwertig
96 Well Platten zur DNA Lagerung	MicroAmp® Fast 96-Well Reaktionsplatten, 0,1 ml, Applied Biosystems (Life Technologies Co.), Katalog-Nr. 4346906, oder gleichwertig
Klebefolien für DNA-Lagerungsplatten	VWR Thermalseal PCR Sealing Film, Katalog-Nr. 391-1254 oder Eppendorf Storage Foil (selbstklebend), Katalog Nr. 0030 127.889, oder gleichwertig
Applikator für das Aufkleben von Klebefolien	MicroAmp® Adhesive Film Applicator, Applied Biosystems, Katalog-Nr. 4333183
Wiederverschließbare Plastiktüten, 10 x 15 cm für das Entsorgen von benutzen PCR-Platten	Carl Roth, Katalog-Nr. P279.2, oder gleichwertig
Kryoröhrchen, 5 ml, selbststehend	VWR, Katalog-Nr. 479-1218, oder gleichwertig
Blutröhrchen	▪ BD Vacutainer® K2EDTA Blood Collection Tubes (Becton Dickinson, Katalog-Nr. 367525) oder ▪ S-Monovette® 9 ml K3E (Sarstedt, Katalog-Nr. 02.1066.001) oder ▪ S-Monovette® 8.5 ml CPDA (Sarstedt, Katalog-Nr. 01.1610.001)

6.3. Benötigte spezielle Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien

Die folgenden speziellen Laborgeräte und Verbrauchsmaterialien werden für den Epi proColon 2.0 CE Test benötigt und können nicht durch andere ersetzt werden.

Für Anwender, die den Epi proColon 2.0 CE Test auf dem **Applied Biosystems® 7500 Fast oder 7500 Fast Dx PCR Gerät** durchführen:

- Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument mit Sequence Detection Software v1.4 21 CFR Part 11 Modul (Life Technologies Co., Katalog-Nr. 4406984 or 4406985) oder

  Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Instrument (Life Technologies Co., Katalog-Nr. 4351106 oder 4351107) mit Sequence Detection Software v1.4 21 CFR Part 11 Modul (Life Technologies Co., Katalog-Nr. 4377355)
- MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaktionsplatte mit Barcode, 0,1 ml (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 20 Platten, Katalog-Nr. 4346906; 200 Platten, Katalog-Nr. 4366932)
- MicroAmp® 96- & 384-Well Optische Abdeckfolie (Applied Biosystems (Life Technologies Co.), 25 Folien, Katalog-Nr. 4360954 oder 100 Folien, Katalog-Nr. 4311971)

Für Anwender, die den Epi proColon 2.0 CE Test auf dem **Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR Gerät I und II** durchführen:

- LightCycler® 480 Instrument I mit 96-Well Heizblock (Roche, Katalog-Nr. 05015278001) und mit Software Version 1.5.x, oder

  LightCycler® 480 Instrument II mit 96-Well Heizblock (Roche, Katalog-Nr. 05015278001) und mit Software Version 1.5.x
- LightCycler® 480 Multiwell Platte 96 (weiß) mit Abdeckfolie (Roche, Katalog-Nr. 04729692001)
- LightCycler® 480 optische Abdeckfolie (Roche, Katalog Nr. 04729757001)

Zusätzliche Laborgeräte, die unabhängig vom verwendeten Real-Time PCR Gerät benötigt werden:

- Magnet Separator: DynaMag™-15 Magnetständer (Invitrogen, Katalog-Nr. 123.01D)
- Magnet Separator: DynaMag™-2 Magnetständer (Invitrogen, Katalog-Nr. 123.21D)

6.4. Geräteanforderungen

Die Installation, Kalibrierung, Funktionsqualifizierung und Wartung des Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrumentes, des Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Instrumentes oder

des Roche LightCycler® 480 Real-Time PCR Instrumentes I oder II muss entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt werden.

Hinweis: Eine monatliche Hintergrundkalibrierung, wie in der Gebrauchsanleitung des Herstellers für das Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR und das Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Instrument beschrieben, ist erforderlich.
Eine halbjährliche Wartung, wie in der Gebrauchsanleitung des Herstellers für das Applied Biosystems® 7500 Fast Dx Real-Time PCR Instrument und für das Applied Biosystems® 7500 Fast Real-Time PCR Instrument beschrieben, ist erforderlich. Diese Wartung muss die Kalibrierung der Farbstoffe FAM™, JOE™, TAMRA™ einschließen.

7. Vorsichtsmaßnahmen

7.1. Vorsichtsmaßnahmen im Labor

Die Einhaltung der Regeln zur Guten Laborpraxis (Good Laboratory Practices, GLP) ist erforderlich, um während und nach der DNA-Extraktion, Bisulfitbehandlung und Reinigung das Risiko einer Kreuzkontamination von Patientenproben zu vermeiden.

Verhindern Sie während der Extraktion das Einbringen von Nukleasen in die Proben. Wir empfehlen ausschließlich Einmal-Pipetten und Einmal-Spitzen zu verwenden, um eine Kreuzkontamination zwischen Patientenproben zu vermeiden. Dieser Test sollte nur von professionellen Laboren durchgeführt werden, die mit Methoden der DNA-Extraktion und real-time PCR vertraut sind.

Um die Kontamination durch Amplifikate vorheriger PCR-Läufe zu verhindern, empfehlen wir die strikte Trennung der prä-PCR Arbeiten (z.B. DNA-Extraktion und Aufreinigung, Ansetzen der PCR-Reaktion) und post-PCR Arbeiten (z.B. real-time PCR). Außerdem empfehlen wir PCR-Platten so zu entsorgen, dass keine PCR-Produkte entweichen können. So sollten z.B. die PCR-Platten sofort nach der PCR in einer verschließbaren Plastiktüte verpackt und dann in einem dafür vorgesehenen Mülleimer entsorgt werden. Lagern Sie niemals benutze PCR-Platten außerhalb des PCR-Instruments. Öffnen Sie niemals benutzte PCR-Platten.

7.2. Vorsichtsmaßnahmen zum Schutz vor Infektionen

Dieses Produkt enthält keine infektiösen Substanzen oder human- oder tierpathogene Erreger.

Humane Blut- und Plasmaproben, die mit diesem Test untersucht werden, sollten grundsätzlich als potentiell infektiös behandelt werden und alle Vorsichtsmaßnahmen eingehalten werden, wie sie in der Richtlinie für mikrobiologische- und biologische Sicherheit für Laboratorien, „Direktive 2000/54/EC über den Schutz der Arbeitnehmer gegen Gefährdung durch biologische Arbeitsstoffe bei der Arbeit", oder anderen Vorschriften zur biologischen Sicherheit vorgeschrieben sind.

8. Probenentnahme und Probenprozessierung

8.1. Blutentnahme und Blutlagerung

Die Blutentnahme und Blutlagerung sollte wie folgt erfolgen:

- Vacutainer® K_2EDTA 10 ml Röhrchen oder S-Monovette® 9 ml K3E Röhrchen sollen für die Blutentnahme entsprechend der Herstellerangaben verwendet werden. Das Plasma sollte sofort nach der Blutentnahme von den Blutzellbestandteilen getrennt werden. Das Blut kann maximal bis zu 24 h bei 2 bis 8 °C gelagert werden, bevor das Plasma gewonnen wird. Blutproben dürfen nicht eingefroren werden.

- Alternativ können für die Blutentnahme S-Monovette® 8.5 ml CPDA Röhrchen entsprechend der Herstellerangaben verwendet werden. Das Plasma sollte sofort nach der Blutabnahme von den Blutzellbestandteilen getrennt werden. Das Blut kann in S-Monovette® 8.5 ml CPDA Röhrchen für maximal 48 h bei 15 bis 25 °C gelagert werden. Blutproben dürfen nicht eingefroren werden.

8.2. Plasmagewinnung und Plasmalagerung

- Schalten Sie die Bremse Ihrer Zentrifuge aus, um eine Vermischung der Zellschichten zu vermeiden.
- Zentrifugieren Sie das Blut im Blutröhrchen für 12 min lang bei 1350 ± 150 rcf. Sollte die Zentrifuge Angaben in UPM (Umdrehungen pro Minute) haben, muss der entsprechende Wert in der Umrechnungstabelle der Bedienungsanleitung des Zentrifugenherstellers nachgeschlagen werden.
- Nehmen Sie das Blutröhrchen aus der Zentrifuge.
- Benutzen Sie eine frische Einmaltransferpipette (15 cm), um das Plasma aus dem Blutröhrchen in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen (PP) mit konischem Boden zu überführen.
- Zentrifugieren Sie das Plasma in dem 15 ml Zentrifugenröhrchen 12 min bei 1350 ± 150 rcf.
- Überführen Sie mit Hilfe einer frischen, extra langen Einmaltransferpipette (22,5 cm) oder serologische Pipette 3,5 ml Plasma aus dem 15 ml Zentrifugenröhrchen in ein beschriftetes Kryoröhrchen oder Zentrifugenröhrchen.
- Das Plasma kann bis zu 4 Wochen bei -15 bis -25 °C gelagert werden.
- Plasmaproben, die aus Vacutainer® K_2EDTA Blut gewonnen wurden, können auch bei 2 bis 8°C bis zu 18 h gelagert werden.

Hinweis: Achten Sie darauf, dass die Schicht des Buffy Coats (Leukozytenfilm), nach dem ersten Zentrifugationsschritt oberhalb der roten Blutkörperchen bzw. nach der zweiten Zentrifugation sedimentiert auf dem Boden des Röhrchens, nicht zerstört oder mittransferiert wird.

9. Testverfahren

Es wird empfohlen, für wiederholtes Pipettieren folgender Reagenzien einen Repeat Pipettor zu verwenden:

- Epi proColon Lysis Binding Buffer
- Epi proColon Magnetic Bead Suspension
- Ethanol in DNA Bindungsschritt 9.2.3.
- Epi proColon Wash A Buffer
- Epi proColon Wash B Buffer
- Epi proColon Elution Buffer
- Epi proColon Bisulfite Solution
- Epi proColon Protection Buffer und
- PCR Master Mix

Außerdem wird dringend empfohlen, einen Rotationsmischer, der ein „Überkopf" Mischen ermöglicht, und keinen Horizontalschüttler, zu verwenden. Es wird weiterhin empfohlen, extrahierte und Bisulfit-behandelte DNA mit einer Referenzpipette zu pipettieren.

9.1. Herstellung der Arbeitslösungen

9.1.1. Verdünnung des Epi proColon Wash A Buffer

- Geben Sie mit Hilfe eines sterilen Messzylinders oder einer serologischen Pipette 60,0 ml absolutes Ethanol (für die Molekularbiologie ≥99.5 %) in das Epi proColon Wash A Concentrate.
- Schließen Sie den Deckel, und mischen Sie gründlich, indem Sie die Flasche vorsichtig fünfmal auf den Kopf stellen. Vermeiden Sie Schaumbildung. Beschriften Sie die Flasche mit dem Datum der Verdünnung und kreuzen Sie das Kästchen "Ethanol added" an.
- Verdünnter Epi proColon Wash A Buffer kann bis zu 6 Wochen bei 15 bis 30 °C aufbewahrt werden.

9.1.2. **Verdünnung des Epi proColon Wash B Buffer**

- Geben Sie mit Hilfe eines sterilen Messzylinders oder einer serologischen Pipette 40,0 ml absolutes Ethanol (für die Molekularbiologie, ≥99.5 %) in das Epi proColon Wash B Concentrate.
- Schließen Sie den Deckel, und mischen Sie gründlich, indem Sie die Flasche vorsichtig fünfmal auf den Kopf stellen. Beschriften Sie die Flasche mit dem Datum der Verdünnung und kreuzen Sie das Kästchen "Ethanol added" an.
- Verdünnter Epi proColon Wash B Buffer kann bis zu 6 Wochen bei 15 bis 30 °C aufbewahrt werden.

9.2. DNA Extraktion und Bisulfit-Konvertierung von Patientenplasma

Der Epi proColon 2.0 CE Test enthält ausreichend Reagenzien, um bis zu 32 Proben inklusive Kontrollen zu bearbeiten. Eine Epi proColon Positive Control und eine Epi proColon Negative Control müssen in jedem Lauf enthalten sein und mit analysiert werden. Da der Kit 4 Röhrchen mit Epi proColon Bisulfite Solution enthält, die nur einmal geöffnet werden dürfen, empfehlen wir, bis zu vier unabhängige Läufe durchzuführen (z.B. 4 Läufe mit jeweils 8 Proben).

Hinweis: Ein kurzes Zentrifugieren von Reaktionsgefäßen (im Text als "anzentrifugieren" bezeichnet) wird bei verschiedenen Schritten im Arbeitsablauf benötigt, um Tropfen vom Deckel zu entfernen oder die Flüssigkeit am Boden zu sammeln. Dafür wird empfohlen, die Röhrchen 10 - 20 sec bei 1.000 ± 150 rcf mit einer Tischzentrifuge zu zentrifugieren. Vermeiden Sie längeres Zentrifugieren oder Zentrifugieren bei höherer rcf, um das Verklumpen der Magnetpartikel bei bestimmten Arbeitsschritten zu vermeiden.

Hinweis: Das Mischen der Röhrchen mit dem Vortex wird bei mehreren Arbeitsschritten benötigt, um eine homogene Mischung der Flüssigkeiten zu gewährleisten. Wir empfehlen, den Vortex auf mittlere Stärke einzustellen und für 5 bis 10 Sekunden zu mischen.

9.2.1. **Auftauen von Plasma und Epi proColon Positive und Negative Kontrollen**

- Tauen Sie 30 min lang eine gefrorene Epi proColon Positive Control und eine Epi proColon Negative Control bei 15 bis 30°C auf.
- Das gefrorene Plasma ebenfalls 30 min lang bei 15 bis 30 °C auftauen.
- Beginnen Sie spätestens 60 min nach dem Auftauen mit der Lyse.

9.2.2. **Lyse**

Hinweis: Epi proColon Lysis Binding Buffer kurz vor Gebrauch schütteln, um festzustellen, ob sich ein Präzipitat gebildet hat. Sind Ablagerungen sichtbar, erwärmen Sie den Epi proColon Lysis Binding Buffer im Wasserbad für 60 min bei 37 °C, und schwenken Sie den Puffer vorsichtig bis sich alle Ablagerungen gelöst haben. Lassen Sie den Epi proColon Lysis Binding Buffer auf Raumtemperatur abkühlen, bevor Sie fortfahren.

- Geben Sie die folgenden Reagenzien in ein beschriftetes 15 ml Zentrifugenröhrchen:
  - 3,5 ml Plasma oder Epi proColon Positive Control oder Epi proColon Negative Control
  - 3,5 ml Epi proColon Lysis Binding Buffer
- Schließen Sie das Röhrchen und mischen es auf dem Vortex für 5-10 sec.
- Inkubieren Sie das Röhrchen auf dem Labortisch für 10 ± 1 min bei 15 bis 30 °C.

9.2.3. **DNA Bindung**

Hinweis: Um eine gute DNA-Ausbeute zu gewährleisten, ist es notwendig, durch Mischen eine homogene Suspension der Epi proColon Magnetic Beads zu erreichen. Abweichende Bead-Mengen (zu viel oder zu wenig) können zu falschen Ergebnissen führen. Um die richtige Konzentration (d.h. homogene Suspension) zu erreichen, sollte die Flasche mit den Epi proColon Magnetic Beads kurz vor

dem Pipettieren solange sorgfältig gemischt werden, bis das Sediment am Boden der Flasche vollständig resuspendiert ist. Auch zwischen den Pipettierschritten muss immer auf eine homogene Suspension geachtet werden.

- Geben Sie die Reagenzien in der angegebenen Reihenfolge in das 15 ml Zentrifugenröhrchen:
  - 90 µl Epi proColon Magnetic Beads (frisch resuspendiert)
  - 2,5 ml absolutes Ethanol (für die Molekularbiologie, ≥99.5 %)
- Schließen Sie das Röhrchen und mischen es durch 5 - 6 maliges invertieren.
- Stellen Sie das 15 ml Röhrchen auf einen Rotationsmischer.
- Inkubieren Sie das Röhrchen auf dem Rotationsmischer bei Raumtemperatur für 45 ± 5 min bei mittlerer Geschwindigkeit (ca. 10 - 20 UPM). Stellen Sie den Winkel des Rotationsmischers auf ca. 35 – 45° ein.

9.2.4. Waschen der DNA

Hinweis: Für den späteren Gebrauch bei der Elution und bei der Bisulfit-Konvertierung stellen Sie die Temperatur des Thermoshakers auf 80 ± 2 °C, bevor Sie mit dem Waschen der DNA beginnen.

- Stellen Sie das 15 ml Zentrifugenröhrchen für 5 - 10 min in den DynaMag™-15 Magnetständer.
- Gießen Sie den Überstand vorsichtig ab. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.
  - Geben Sie 1,5 ml Epi proColon Wash A Buffer dazu.
- Resuspendieren Sie die Magnetpartikel vollständig durch Mischen auf dem Vortex für 5-10 sec.
- Überführen Sie die Suspension mit den Magnetpartikeln mit Hilfe einer extra langen Einmaltransferpipette (22,5 cm) in ein beschriftetes 2,0 ml Reaktionsgefäß.
- Stellen Sie die Einmaltransferpipette zurück in das 15 ml Zentrifugenröhrchen, um restliche Magnetpartikel zu sammeln, und überführen Sie diese auch in das 2,0 ml Reaktionsgefäß.
- Stellen Sie das 2,0 ml Reaktionsgefäß für 2 – 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit einer 15 cm Einmaltransferpipette so viel Puffer wie möglich, während das 2,0 ml Reaktionsgefäß noch immer im DynaMag™-2 Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das 2,0 ml Reaktionsgefäß für 2 - 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit Hilfe einer 10 - 100 µl Referenzpipette so viel verbliebenen Puffer wie möglich, während das 2,0 ml Reaktionsgefäß noch immer im DynaMag™-2 Magnetständer steht.

9.2.5. Elution

- Überführen Sie das Reaktionsgefäß in ein nicht-magnetisches Rack.
- Mischen Sie die Epi proColon Elution Buffer Flasche auf einem Vortex für 5-10 sec.
- Geben Sie 100 µl Epi proColon Elution Buffer in jedes Reaktionsgefäß.
- Schließen Sie das Reaktionsgefäß.
- Resuspendieren Sie die Magnetpartikel durch Mischen auf dem Vortex für 5-10 sec.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 10 ± 1 min bei 1,000 ± 100 UPM und 80 ± 2 °C in einen Thermoshaker.
- Das Reaktionsgefäß kurz anzentrifugieren.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 - 6 min in einen DynaMag™-2 Magnetständer.
- Überführen Sie das komplette Eluat (~100 µl DNA Lösung) in ein frisches 2,0 ml Reaktionsgefäß, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht.
- Verwerfen Sie das 2,0 ml Reaktionsgefäß mit den Magnetpartikeln.

9.2.6. Lagerung der extrahierten DNA

Hinweis: Wenn Sie die extrahierte DNA nicht sofort weiterverarbeiten, können Sie die DNA bei 2 bis 8 °C bis zu 24 h lagern. Extrahierte DNA **darf nicht eingefroren** werden.

9.2.7. Bisulfit-Konvertierung

Hinweis: Die Epi proColon Bisulfite Solution reagiert mit dem Luftsauerstoff. Verwenden Sie daher nur ungeöffnete Röhrchen der Epi proColon Bisulfite Solution. Die angebrochene Lösung kann nicht gelagert werden, sondern muss sofort entsorgt werden!

- Geben Sie die folgenden Reagenzien in das 2,0 ml Reaktionsgefäß mit dem Eluat (~100 µl DNA Lösung):
  - 150 µl Epi proColon Bisulfite Solution
  - 25 µl Epi proColon Protection Buffer
- Verschließen Sie das Reaktionsgefäß und mischen Sie die Bisulfit-Reaktionsmischung auf dem Vortex für 5-10 sec.
- Das 2,0 ml Reaktionsgefäß kurz anzentrifugieren.
- Inkubieren Sie das Reaktionsgefäß **ohne** Schütteln bei 80 ± 2 °C in einen Thermoshaker für 45 ± 5 min.
- Entnehmen Sie das Reaktionsgefäß sofort nach Ablauf der Inkubationszeit von 45 ± 5 min.
- Stellen Sie die Temperatur des Thermoshakers für den späteren Gebrauch auf 23 ± 2 °C, oder benutzen Sie einen zweiten Thermoshaker.

9.2.8. DNA-Bindung

Hinweis: Um eine gute Ausbeute zu gewährleisten, ist es notwendig, durch Mischen eine homogene Suspension der Epi proColon Magnetic Beads zu erreichen. Abweichende Bead-Mengen (zu viel oder zu wenig) können zu falschen Ergebnissen führen. Um die richtige Konzentration (d.h. homogene Suspension) zu erreichen, sollte die Flasche kurz vor dem Pipettieren mit den Epi proColon Magnetic Beads solange sorgfältig gemischt werden, bis das Sediment am Boden der Flasche vollständig resuspendiert ist. Auch zwischen den Pipettierschritten muss immer auf eine homogene Suspension geachtet werden.

- Zentrifugieren Sie das 2,0 ml Reaktionsgefäß mit der Bisulfit-Reaktion kurz an.
- Fügen Sie die folgenden Reagenzien hinzu:
  - 1000 µl Epi proColon Wash A Buffer
  - 20 µl Epi proColon Magnetic Beads (frisch suspendiert).
- Mischen Sie mit dem Vortex für 5-10 sec.
- Warten Sie bis der Thermoshaker 23 ± 2 °C erreicht hat.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß in den Thermoshaker und inkubieren Sie bei 23 ± 2 °C für 45 ± 5 min bei 1000 ± 100 UPM.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 - 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entnehmen Sie mit Hilfe einer frischen 15 cm Einmaltransferpipette so viel Flüssigkeit wie möglich, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.

9.2.9. Erster Waschschritt

- Nehmen Sie zum Waschen die Proben im Rack vom Magneten, mischen Sie auf dem Vortex und geben Sie folgendes Reagenz hinzu:
  - 800 µl Epi proColon Wash A Buffer.
- Mischen Sie auf dem Vortex für 5-10 sec.

- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 - 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit Hilfe einer frischen 15 cm Einmaltransferpipette so viel Flüssigkeit wie möglich, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.

9.2.10. Zweiter Waschschritt

- Nehmen Sie zum Waschen die Proben im Rack vom Magneten, mischen Sie mit dem Vortex und geben Sie folgendes Reagenz hinzu:
  - 800 µl Epi proColon Wash B Buffer.
- Mischen Sie mit dem Vortex für 5-10 sec.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 - 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit Hilfe einer frischen 15 cm Einmaltransferpipette so viel Flüssigkeit wie möglich, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.

9.2.11. Dritter Waschschritt

- Nehmen Sie zum Waschen die Proben im Rack vom Magneten, mischen Sie mit dem Vortex und geben Sie folgendes Reagenz hinzu:
  - 400 µl Epi proColon Wash B Buffer.
- Mischen Sie mit dem Vortex für 5-10 sec.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 - 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit Hilfe einer frischen 15 cm Einmaltransferpipette so viel Flüssigkeit wie möglich, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz an.
- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 - 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Entfernen Sie mit Hilfe einer 10 - 100 µl Referenzpipette so viel Flüssigkeit wie möglich, während das Reaktionsgefäß noch immer im Magnetständer steht. Achten Sie darauf, keine Magnetpartikel zu verlieren.

9.2.12. Trocknen der DNA

Hinweis: Verlängern Sie die Trocknungszeit bzw. erhöhen Sie die Temperatur nicht. Veränderte Bedingungen können zu einer reduzierten bisDNA-Ausbeute führen!

- Inkubieren Sie das Reaktionsgefäß mit geöffnetem Deckel in einem Thermoshaker bei 23 ± 2 °C für 10 ± 1 min ohne zu schütteln.

9.2.13. Elution

- Stellen Sie das Reaktionsgefäß in ein nicht-magnetisches Rack und fügen Sie folgendes Reagenz hinzu:
  - 60 µl Epi proColon Elution Buffer.
- Schließen Sie den Deckel des Reaktionsgefäßes.
- Mischen Sie die Magnetpartikel mit dem Vortex für 5-10 sec.
- Inkubieren Sie das Reaktionsgefäß in einem Thermoshaker bei 23 ± 2 °C unter Schütteln bei 1000 ± 100 rpm für 10 ± 1 min.
- Zentrifugieren Sie das Reaktionsgefäß kurz.

- Stellen Sie das Reaktionsgefäß für 2 - 6 min in den DynaMag™-2 Magnetständer.
- Transferieren Sie das komplette Eluat (~60 µl DNA Lösung) mit einer 10 - 100 µl Referenzpipette in eine 96-Well Platte und verschließen Sie die Platte mit einer Klebefolie. Zum Verschleißen verwenden Sie einen Applikator für das Aufkleben von Klebefolien.
- Für die bisDNA-Platte wird folgende Plattenbelegung empfohlen (Tabelle 4).

Tabelle 4: Empfohlene Plattenbelegung für die bisDNA-Platte.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC#	S7										
B	NC$	S8										
C	S1	S9										
D	S2	S10										
E	S3	S11										
F	S4	S12										
G	S5	S13										
H	S6	S14										

#Epi proColon Positive Control, $Epi proColon Negative Control, S1 - S14 Patientenproben

9.2.14. Lagerung der bisulfit-konvertierten DNA

Sollte die bisulfit-konvertierte DNA (bisDNA) nicht unmittelbar verwendet werde, können Sie die DNA bei 2 bis 8 °C für bis zu 24 Stunden oder bei -25 bis -15 °C für bis zu 72 Stunden lagern.

9.3. Vorbereitung der PCR

Hinweis: Jede bisDNA (Patientenprobe oder Epi proColon Positive Control, oder Epi proColon Negative Control) muss als Triplikat untersucht werden.

Hinweis: Zentrifugieren Sie die Epi proColon Polymerase vor ihrer Verwendung für 10 - 20 sec bei 1.000 ± 150 rcf mit einer Tischzentrifuge, um Tropfen vom Deckel zu entfernen.

9.3.1. Herstellung des PCR Master Mixes

- Je nach Anzahl von Patientenproben und Kontrollproben, müssen 1 oder 2 Epi proColon PCR Mix Röhrchen aufgetaut werden (siehe Tabelle 5).
- Mischen Sie das/die Epi proColon PCR Mix Röhrchen für 5-10 sec auf dem Vortex und zentrifugieren Sie die Röhrchen anschließend kurz an.
- Überführen Sie das entsprechende Volumen des Epi proColon PCR Mixes und der Epi proColon Polymerase wie in Tabelle 5 angegeben in ein 2,0 ml Reaktionsgefäß.
- Mischen Sie den PCR Master Mix mit dem Vortex für 5-10 sec.
- Zentrifugieren Sie den PCR Master Mix kurz an, um Tropfen vom Deckel zu entfernen.

Hinweis: Verwenden Sie den PCR Master Mix unmittelbar nach der Herstellung, und lagern Sie diesen nicht. Nicht verwendete Epi proColon Polymerase und Epi proColon PCR Mix ist sofort nach der Benutzung wieder einzufrieren.

Hinweis: Für einen einzelnen PCR-Ansatz benötigen Sie 16,0 µl Epi proColon PCR Mix und 0,8 µl Epi proColon Polymerase. In diesem Volumen ist bereits eine ausreichende Pipettiertoleranz berücksichtigt. Zur Herstellung des PCR Master Mixes muss deshalb kein zusätzliches Volumen einkalkuliert werden.

Tabelle 5: Herstellung des PCR Master Mixes mit entsprechender Pipettiertoleranz.

Komponente	**Benötigtes Volumen für 8 Bestimmungen (24 PCRs)**	**Benötigtes Volumen für 16 Bestimmungen (48 PCRs)**	**Benötigtes Volumen für 24 Bestimmungen (72 PCRs)**	**Benötigtes Volume für 32 Bestimmungen (96 PCRs)**
Epi proColon PCR Mix	384 µl	768 µl	1152 µl	1536 µl
Epi proColon Polymerase	19,2 µl	38,4 µl	57,6 µl	76,8 µl

Tabelle 6: Empfohlene Plattenbelegung der PCR-Platten.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	PC#	PC#	PC#	S7	S7	S7						
B	NC$	NC$	NC$	S8	S8	S8						
C	S1	S1	S1	S9	S9	S9						
D	S2	S2	S2	S10	S10	S10						
E	S3	S3	S3	S11	S11	S11						
F	S4	S4	S4	S12	S12	S12						
G	S5	S5	S5	S13	S13	S13						
H	S6	S6	S6	S14	S14	S14						

#Epi proColon Positive Control, $Epi proColon Negative Control, S1-S14 Patientenproben

Hinweis: Wenn die PCR mit dem Applied Biosystems 7500 Fast PCR Instrument oder 7500 Fast Dx PCR Instrument mit der SDS v1.4 Software durchgeführt wird, folgen Sie den Anweisungen in Kapitel 10 und 13.

Wenn die PCR mit dem Roche LightCycler 480 Instrument I durchgeführt wird, folgen Sie den Anweisungen in Kapitel 11 und 13.

Wenn die PCR mit dem Roche LightCycler 480 Instrument II durchgeführt wird, folgen Sie den Anweisungen in Kapitel 12 und 13.

10. Analyse mit Applied Biosystems 7500 Fast und 7500 Fast Dx PCR Instrument

10.1. Softwareanforderungen

Dieses Produkt wurde mit der SDS v1.4 Software mit 21 CFR Part 11 Modul validiert.

10.2. Herstellung der PCR-Platte (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

- Pipettieren Sie die PCR Platte entsprechend der empfohlenen Plattenbelegung (siehe Tabelle 6).
- Überführen Sie 15 µl PCR Master Mix in die entsprechenden Positionen der MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaktionsplatte.
- Wenn notwendig, zentrifugieren Sie die bisDNA Lagerplatte aus Abschnitt 9.2.13 für 1 min bei 1.000 ± 100 rcf in einer Plattenzentrifuge.
- Fügen Sie 15 µl der bisDNA-Lösung in die entsprechenden Positionen der PCR-Platte.
- Verschließen Sie die PCR-Platte mit einer MicroAmp® 96-Well optischen Abdeckfolie.
- Zentrifugieren Sie die PCR-Platte mit einer Plattenzentrifuge für 1 min bei 1.000 ± 100 rcf kurz an.

Hinweis: Die beladene PCR-Platte kann bis zu 4 h bei 2 bis 8 °C im Kühlschrank gelagert werden.

10.3. Laden der PCR-Platte (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)

Hinweis: Der PCR Master Mix enthält kein ROX oder einen anderen Referenzfarbstoff. Daher muss die passive Referenz auf "none" gesetzt werden.

Hinweis: Wir empfehlen, eine Templat-Datei (*.sdt) mit den angegebenen PCR-Bedingungen abzuspeichern.

- Starten Sie die Softwareversion SDS v1.4.
- Laden Sie die entsprechende Templat-Datei oder erstellen Sie ein neues Plattendokument.
- Klicken Sie auf "Create New Document".
- Definieren Sie die folgenden Einstellungen im Plattendokument:
  - Assay: Standard Curve (Absolute Quantification)
  - Container: 96-Well Clear
  - Template: Blank Document (oder wählen Sie die entsprechende Epi proColon 2.0 CE Templat-Datei)
  - Run Mode: Standard 7500.
- Klicken Sie auf "Next".
- Klicken Sie auf "New Detector…".
- Erstellen Sie einen neuen Detektor mit den folgenden Einstellungen:
  - Name: Septin9
  - Description: Epi proColon 2.0 CE
  - Reporter dye: FAM
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Red.
- Klicken Sie auf "Create Another" mit den folgenden Einstellungen:
  - Name: ACTB
  - Description: Epi proColon 2.0 CE
  - Reporter dye: JOE
  - Quencher dye: (none)
  - Color: Green.
- Klicken Sie auf "ok".
- Wählen Sie beide Detektoren an und klicken Sie "Add >>", um die Detektoren dem Plattendokument zuzuweisen.
- Wählen Sie "(none)" im Drop-down Menü bei "Passive Reference".
- Klicken Sie auf "Done".
- Gehen Sie auf das Menü "Setup" und "Plate".
- Wählen Sie alle 96 Wells der Platte aus.
- Gehen Sie in das Menü "View" und öffnen Sie den "Well Inspector".
- Wählen Sie die Detektoren "Septin9" und "ACTB".
- Überprüfen Sie, dass die passive Referenz auf "(none)" gesetzt ist (siehe Abbildung 1).
- Klicken Sie auf "Close".
- Gehen Sie zum Menüpunkt "Instrument", um das PCR-Programm wie in Tabelle 7 beschrieben zu programmieren.
- Ändern Sie die folgenden Einstellungen:
  - Sample Volume: 30 µl,
  - Run Mode: Standard 7500,

  - o Data Collection: Stage 2, Step 2.
- Erstellen Sie ein "Thermal Profile" mit drei Phasen (stages).
- Erstellen Sie "Stage 2" mit drei Schritten (steps), und "Stage 1" und "Stage 3" mit jeweils einem Schritt (step).
- Tragen Sie die Anzahl der Wiederholungen (repetitions), die Zieltemperaturen (target) und die Wartezeiten (hold) entsprechend der Angaben in Tabelle 7 ein.
- Ändern Sie die Heizrate ("Ramp Rate") wie in Tabelle 7 angegeben.
- Stellen Sie den Wert "Data Collection" für "Stage 2, Step 2" auf "(55.5 @ 0:35)" ein.
- Überprüfen Sie die Einstellungen für das Thermal Cycler Protokoll mit den in Tabelle 7 angegebenen Werten (siehe Abbildung 2).
- Speichern Sie die Templat-Datei unter einem geeigneten Namen.
- Öffnen Sie die Ladeklappe.
- Stellen Sie die PCR-Platte in den Rahmen (die Position A1 muss sich in der oberen linken Ecke befinden) und stellen Sie sicher, dass die Platte genau in den Rahmen passt. Schließen Sie die Ladeklappe.
- Klicken Sie auf "Start", um die PCR zu starten.

Tabelle 7: Thermal Cycler Programm für Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx.

Program Parameter	**Denaturierung**	**Zyklen**			**Abkühlen**
PCR Phase (stage)	"Stage 1"	"Stage 2"			"Stage 3"
Wiederholungen (repetitions)	1	45			1
Segment (step)	1	1	2	3	1
Zieltemperatur [°C] (target)	94	62	55.5	93	40
Dauer [mm:ss] (hold)	20:00	00:05	00:35	00:30	00:05
Auto Verlängerung (auto increment)		0	0	0	
Heizrate [%] (ramp rate)	40	80	80	40	80
Datenerfassung (data collection)	Stage 2, Step 2 (55.5 @ 0:35)				

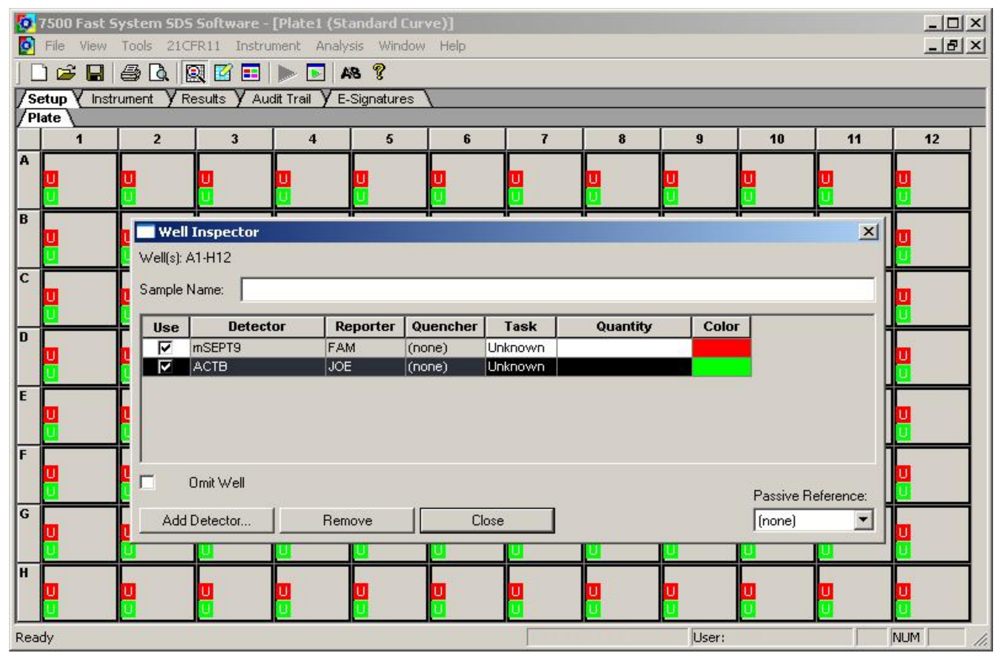


Abbildung 1: „Screenshot“ der SDS v1.4 Software nach Bestätigung der Einstellungen im 'Well Inspector' Window.

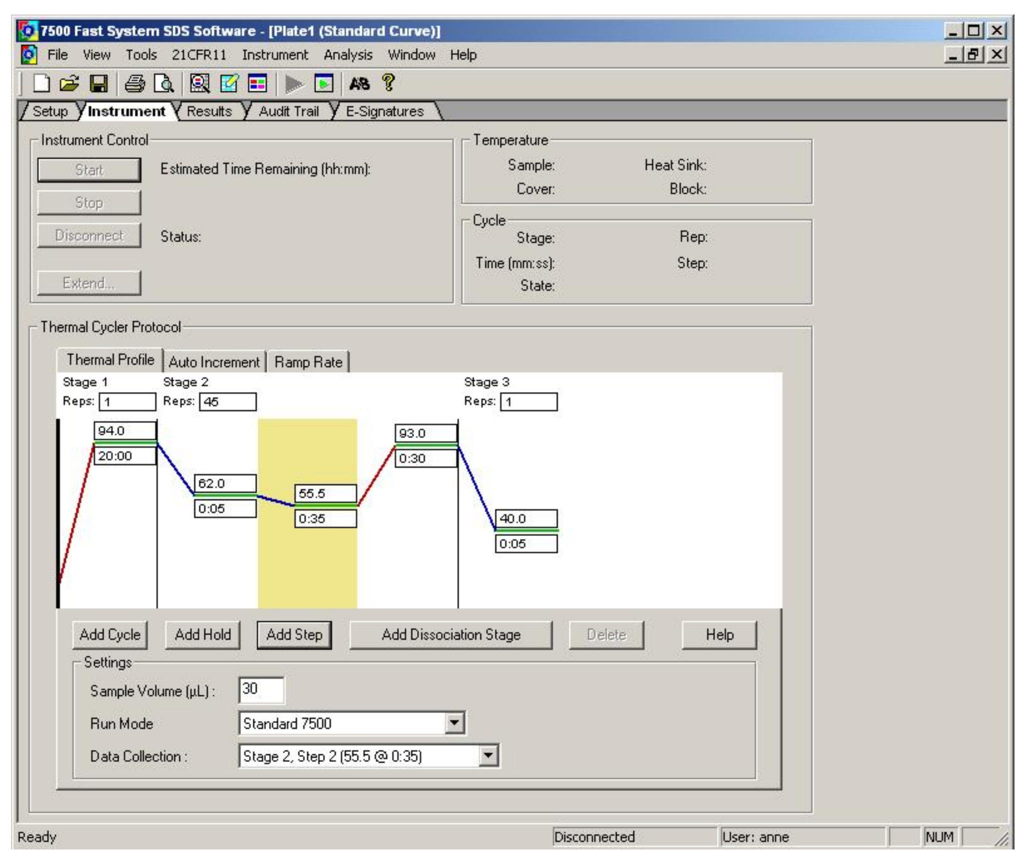


Abbildung 2: „Screenshot“ der SDS v1.4 Software nach dem Erstellen des PCR-Programms.

10.4. **Ergebnisanalyse (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)**

Hinweis: Analysieren Sie die PCR-Läufe ausschließlich mit der SDS v1.4 Software.

Hinweis: Unvollständige Läufe bzw. Läufe mit angezeigten Fehlermeldungen dürfen nicht analysiert werden. Der Lauf muss Fluoreszenzdaten für 45 Zyklen enthalten.

- Nach Beendigung des PCR-Laufs klicken Sie auf “ok”.
- Gehen Sie in das Menü “Results” und wählen Sie den Menüpunkt “Amplification Plot“.
- Definieren Sie folgende Einstellungen für den Septin9 Detektor im Menü “Analysis Setting”:
    - o Data: „Delta Rn vs Cycle“
    - o Detector: “Septin9”
    - o Line color: “Detector Color”
    - o Manual Ct, Threshold: “50000” (erscheint als “5.0e+004”)
    - o Manual baseline, Start (cycle): “10”
    - o Manual baseline, End (cycle): „22“
- Definieren Sie folgende Einstellungen für den ACTB Detektor im Menü “Analysis Setting”:
    - o Data „Delta Rn vs Cycle“
    - o Detector: “ACTB”
    - o Line color: “Detector Color”
    - o Manual Ct, Threshold: „25000“ (erscheint als “2.5e+004”)
    - o Manual baseline, Start (cycle): „10“
    - o Manual baseline, End (cycle): „22“
- Klicken Sie auf “Analyze”.
- Klicken Sie auf “Save”.
- Septin9 Ct-Werte und ACTB Ct-Werte werden automatisch berechnet.
- Wählen Sie die Positionen aus, die Sie analysieren wollen.
- Die Amplifikationskurven werden im Menü “Amplification Plot” angezeigt.
- Die Ct-Werte werden im Menü “Report” angezeigt.

Hinweis: Jede Amplifikationskurve sollte visuell untersucht werden. Amplifikationskurven mit widersprüchlichen Datenpunkten (noise peaks) oder linearem Kurvenverlauf sollten als negativ bewertet werden. Beispiele zeigt die Abbildung 3.

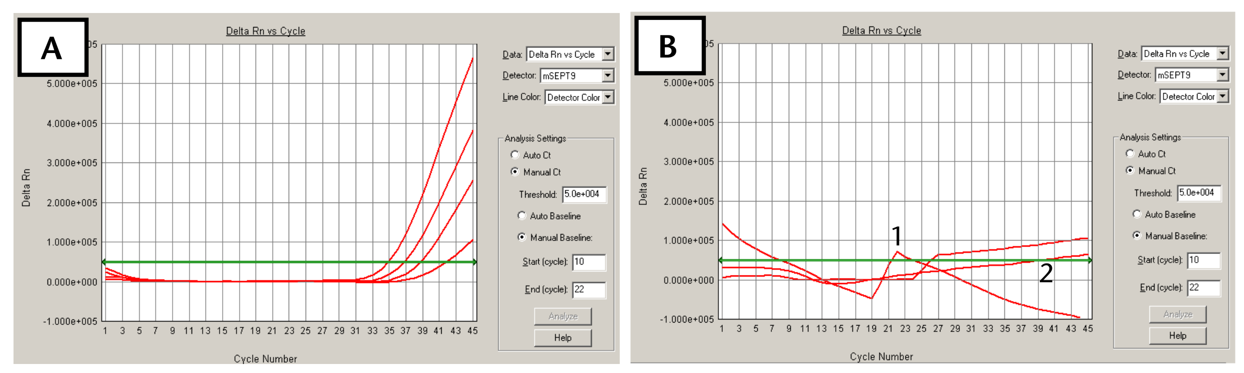


Abbildung 3: “Screenshots” von Septin9 Amplifikationskurven vom Applied Biosystems 7500 Fast. A: Beispiel für valide Amplifikationskurven. B: Beispiel für negative Kurven aufgrund widersprüchlicher Datenpunkte (1) oder linearem Kurvenverlauf (2).

10.5. **Validität der Epi proColon Kontrollen (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)**

Ein Lauf (ein oder mehrere Patientenproben, die zusammen mit einer Epi proColon Positive Control und einer Epi proColon Negative Control prozessiert wurden) ist valide, wenn die Kriterien aus Tabelle 8 für **ALLE DREI (3)** PCR Replikate von jeder Kontrolle erfüllt sind.

Wenn entweder die Epi proColon Positive Control oder die Epi proColon Negative Control (oder beide) invalide sind, können die Patientenproben, die zusammen mit den Kontrollen prozessiert wurden, nicht bewertet werden. Der Test muss für alle Proben in solch einem Lauf wiederholt werden.

Tabelle 8: Validitätskriterien für Epi proColon Kontrollen analysiert auf Applied Biosystems 7500 Fast / 7500 Fast Dx.

Ergebnis der Kontrolle	Bestimmung	Septin9 Ergebnis	ACTB Ergebnis
Valide Epi proColon Positive Control	PCR1 PCR2 PCR3	Ct* ≤ 41.1 Ct* ≤ 41.1 Ct* ≤ 41.1	Ct* ≤ 29.8 Ct* ≤ 29.8 Ct* ≤ 29.8
Valide Epi proColon Negative Control	PCR1 PCR2 PCR3	kein Ct* bestimmt (“Undetermined”)	Ct* ≤ 37.2 Ct* ≤ 37.2 Ct* ≤ 37.2

*Cycle Threshold (Schwellenwertzyklus)

10.6. **Interpretation von Ergebnissen einzelner PCR-Reaktionen (Applied Biosystems 7500 Fast / Fast Dx)**

Die Interpretation einer einzelnen PCR erfolgt gemäß Tabelle 9. Wenn das Ergebnis der internen ACTB Kontrolle eine ausreichende DNA-Menge in der Einzel-PCR ausweist (Wert für Schwellenwertzyklus von ACTB siehe Tabelle 9), bestimmt das Ergebnis der Septin9 PCR das Ergebnis dieser Einzel-PCR. Ein ACTB Wert oberhalb des in Tabelle 9 definierten Werts kennzeichnet eine “Invalide PCR”.

Tabelle 9: Interpretation der Einzel-PCR Ergebnisse (Applied Biosystems 7500 Fast /Fast Dx).

Einzel-PCR Ergebnis	Septin9 Ergebnis	ACTB Ergebnis
Septin9 Positiv	Ct* < 45	Ct* ≤ 32.1
Septin9 Negativ	kein Ct* bestimmt (“Undetermined”)	Ct* ≤ 32.1
Invalide	jedes Ergebnis	Ct* > 32.1 oder "Undetermined“

*Cycle Threshold (Schwellenwertzyklus)

11. Analyse mit dem Roche LightCycler® 480 Instrument I

11.1. Herstellung der PCR-Platte (LightCycler 480 Instrument I)

- Pipettieren Sie die PCR Platte, entsprechend der in Tabelle 6 empfohlenen Plattenbelegung.
- Überführen Sie 15 µl PCR Master Mix in die entsprechenden Positionen der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 Reaktionsplatte.
- Zentrifugieren Sie die bisDNA-Platte aus Abschnitt 9.2.13 für 1 min bei 1.000 ± 100 rcf mit einer Plattenzentrifuge.
- Fügen Sie 15 µl der bisDNA-Lösung in die entsprechenden Positionen der PCR-Platte.
- Verschließen Sie die PCR-Platte mit einer LightCycler® 480 optischen Abdeckfolie.
- Zentrifugieren Sie die PCR-Platte für 1 min bei 1.000 ± 100 rcf mit einer Plattenzentrifuge.

Hinweis: Die beladene PCR-Platte kann bis zu 4 h bei 2 bis 8 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

11.2. Laden der PCR-Platte (LightCycler 480 Instrument I)

Hinweis: Wir empfehlen eine Templat-Datei (*.ixo) mit den angegebenen PCR-Bedingungen abzuspeichern.

- Starten Sie die 1.5.x Software.
- Erstellen Sie ein neues Experiment, indem Sie auf "New Experiment" klicken.
- Laden Sie die entsprechende Templat-Datei oder erstellen Sie eine neue Datei entsprechend der Angaben zum PCR-Programm in Tabelle 10.
- Öffnen Sie die Ladeklappe.
- Stellen Sie die PCR-Platte in den Rahmen (die Position A1 muss sich in der oberen linken Ecke befinden) und stellen Sie sicher, dass die Platte genau in den Rahmen passt. Schließen Sie die Ladeklappe.
- Klicken Sie auf "Start Run", um die PCR zu beginnen.

Tabelle 10: Standard PCR-Programm für das LightCycler® 480 Instrument I.

Programm Parameter	Denaturierung	Zyklen			Abkühlung
Analyse Modus	None	Quantification Mode			None
Zyklen	1	50			1
Segment	1	**1**	**2**	**3**	1
Zieltemperatur [°C]	94	62	56	93	40
Dauer [hh:mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:35	00:00:30	00:00:30
Heizrate [°C/s]*	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
Detektionsmodus	keine	keine	einmalig	keine	keine

* LightCycler® 480 Instrument I: Wählen Sie das Detektionsformat „Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe"; aktivieren Sie die Filterkombination 483 - 533 nm und 523 - 568 nm und setzten Sie das "Reaction Volume" auf „30".

11.3. Ergebnisanalyse (LightCycler 480 Instrument I)

Hinweis: Benutzer des LightCycler® 480 Instrument I müssen die *Color Compensation* auf "ON" stellen und die entsprechende "Epi proColon Color Compensation" Datei für die Filterkombination "Filter Comb 483 - 533" und "Filter Comb 523 - 568" laden.

Hinweis: Führen Sie die Datenanalyse ausschließlich auf belegten Well-Positionen durch, indem Sie ein entsprechendes "sample sub set", wie im Benutzerhandbuch des LightCycler® 480 Instruments I beschrieben, definieren.

- Klicken Sie auf “Analysis” in der LightCycler® 480 Basic Software, um das “Analysis Overview” Fenster zu öffnen.
- Wählen Sie “Abs Quant/Fit Points” für alle Proben aus.
- Aktivieren Sie die “Epi proColon Color Compensation”.
- Aktivieren Sie die Filterkombination “Filter Comb 483 - 533“.
- Setzen Sie den ersten Zyklus “First Cycle” auf “1” und den letzten Zyklus “Last Cycle” auf “50”.
- Stellen Sie den Hintergrund auf “5 - 22” (klicken Sie auf den blauen “background” Knopf), in dem Sie “Min Offset“ auf “4“ und “Max Offset“ auf “21“ im Fenster “Cycle Range” setzen.
- Stellen Sie die Hintergrundkompensation im “Noise Band”-Fenster auf “Noise Band (Fluoresc)“ und setzen Sie den Grenzwert auf “ 1.6“.
- Stellen Sie im “Analysis“-Fenster den “Threshold (Manual)” Grenzwert auf “1.6“.
- Stellen Sie im “Analysis“-Fenster die Anzahl der Fit Points auf “2“ ein.
- Drücken Sie auf “Calculate”.

Der **Septin9 Crossing Point (“CP”)** wird für jede Probe automatisch berechnet und in der Ergebnistabelle angezeigt.

- Exportieren Sie die CP Werte durch Anklicken der Ergebnistabelle mit der rechten Maustaste. Wählen Sie “Export” aus. Speichern sie den Datensatz unter einem spezifischen, für Sie zweckmäßigen Namen.
- Wählen Sie “Filter Comb 523-568” aus.
- Setzen Sie “First Cycle“ auf “1“ und “Last Cycle“ auf “50“.
- Legen Sie den Hintergrund (nach Anklicken des blauen „Background“ Knopfes) auf “5-22” fest indem Sie “Min Offset“ auf “4“ und “Max Offset“ auf “21“ im Fenster “Cycle Range” setzen.
- Stellen Sie die Hintergrundskompensation im “Noise Band”-Fenster auf “Noise Band (Fluoresc)“ und setzen Sie den Grenzwert auf “0.8“.
- Stellen Sie im “Analysis“-Fenster den “Threshold (Manual)” Grenzwert auf “0.8“.
- Stellen Sie im “Analysis“-Fenster die Anzahl der Fit Points auf “2“ ein.
- Drücken Sie auf “Calculate”.

Die **ACTB CP-Werte** für jede Probe werden automatisch berechnet und in der Ergebnistabelle angezeigt.

- Exportieren Sie die CP-Werte durch Anklicken der Ergebnistabelle mit der rechten Maustaste. Wählen Sie “Export” aus. Speichern sie den Datensatz unter einem spezifischen, für Sie zweckmäßigen Namen.

Hinweis: Passen Sie den “Noise Band” und den “Threshold” so an, dass er kurz über dem Hintergrund liegt und dass die Amplifikationskurven am Anfang der Exponentiellen Phase der PCR geschnitten werden. Amplifikationskurven ohne signifikanten exponentiellen Anstieg sind als negativ zu werten.

11.4. Validität der Epi proColon Kontrollen (LightCycler 480 Instrument I)

Ein Lauf (ein oder mehrere Patientenproben, die zusammen mit einer Epi proColon Positive Control und einer Epi proColon Negative Control) prozessiert werden) ist valide, wenn die Kriterien aus Tabelle 11 für **ALLE DREI (3)** PCR Replikate von jeder Kontrolle erfüllt sind.

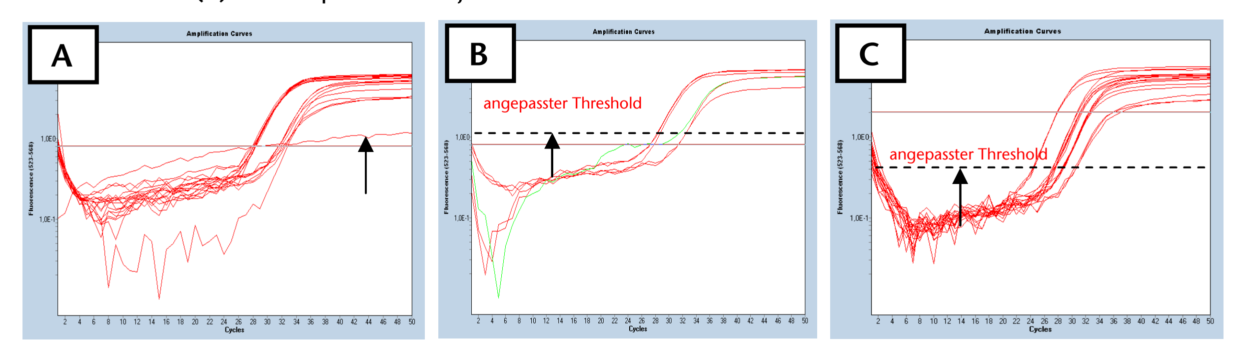


Abbildung 4: Screenshots einer Septin9 Amplifikationskurve auf einem LightCycler 480. A: Amplifikationskurven ohne signifikanten exponentiellen Anstieg sind als negativ zu werten. B: Passen Sie den “Noise Band” und den “Threshold” so an, dass er kurz über dem Hintergrund liegt. C: Passen Sie den “Noise Band” und den “Threshold” so an, dass die Amplifikationskurven am Anfang der Exponentiellen Phase der PCR geschnitten werden.

Wenn entweder die Epi proColon Positive Control oder die Epi proColon Negative Control (oder beide) invalide sind, können die Patientenproben, die zusammen mit den Kontrollen prozessiert wurden, nicht bewertet werden. Der Test muss für alle Proben in solch einem Lauf wiederholt werden.

Tabelle 11: Validitätskriterien für die Epi proColon Kontrollen (LightCycler 480 Instrument I).

Ergebnis der Kontrollen	Bestimmung	Septin9 Ergebnis	ACTB Ergebnis
Valide Epi proColon Positive Control	PCR1 PCR2 PCR3	CP* ≤ 40.6 CP* ≤ 40.6 CP* ≤ 40.6	CP* ≤ 29.5 CP* ≤ 29.5 CP* ≤ 29.5
Valide Epi proColon Negative Control	PCR1 PCR2 PCR3	kein CP* bestimmt	CP* ≤ 36.5 CP* ≤ 36.5 CP* ≤ 36.5

*Crossing Point (Schwellenwertzyklus)

11.5. Interpretation von Ergebnissen einzelner PCR-Reaktionen (LightCycler 480 Instrument I)

Die Interpretation einer einzelnen PCR erfolgt gemäß Tabelle 12. Wenn das Ergebnis der internen ACTB Kontrolle eine ausreichende DNA Menge in der Einzel-PCR ausweist (Wert für Schwellenwertzyklus von ACTB siehe Tabelle 12), bestimmt das Ergebnis der Septin9 PCR das Ergebnis der Einzel-PCR. Ein ACTB Wert oberhalb des in Tabelle 12 definierten Werts kennzeichnet eine “Invalide PCR”.

Tabelle 12: Interpretation der Einzel-PCR Ergebnisse (LightCycler 480 Instrument I).

Einzel-PCR Ergebnis	Septin9 Ergebnis	ACTB Ergebnis
Septin9 Positiv	CP* < 50	CP* ≤ 33.1
Septin9 Negativ	kein CP* bestimmt	CP* ≤ 33.1
Invalide	jedes Ergebnis	CP* > 33.1

*Crossing Point (Schwellenwertzyklus)

12. Analyse mit dem Roche LightCycler® 480 Instrument II

12.1. Herstellung der PCR-Platte (LightCycler 480 Instrument II)

- Pipettieren Sie die PCR Platte entsprechend der empfohlenen Plattenbelegung (sieh Tabelle 6).
- Überführen Sie 15 µl PCR Master Mix in die entsprechenden Positionen der LightCycler® 480 Multiwell Plate 96 Reaktionsplatte.
- Zentrifugieren Sie die bisDNA-Platte aus Abschnitt 9.2.13 für 1 min bei 1.000 ± 100 rcf mit einer Plattenzentrifuge.
- Fügen Sie 15 µl der bisDNA-Lösung in die entsprechenden Positionen der PCR-Platte.
- Verschließen Sie die PCR-Platte mit einer LightCycler® 480 optischen Abdeckfolie.
- Zentrifugieren Sie die PCR-Platte für 1 min bei 1.000 ± 100 rcf mit einer Plattenzentrifuge.

Hinweis: Die beladene PCR-Platte kann bis zu 4 h bei 2 bis 8 °C im Kühlschrank aufbewahrt werden.

12.2. Laden der PCR-Platte (LightCycler 480 Instrument II)

Hinweis: Wir empfehlen eine Templat-Datei (*.ixo) mit den angegebenen PCR-Bedingungen abzuspeichern.

- Starten Sie die 1.5.x Software.
- Erstellen Sie ein neues Experiment, indem Sie auf “New Experiment” klicken.
- Laden Sie die entsprechende Templat-Datei oder erstellen Sie eine neue Datei entsprechend der Angaben zum PCR-Programm in Tabelle 13.
- Öffnen Sie die Ladeklappe.
- Stellen Sie die PCR-Platte in den Rahmen (die Position A1 muss sich in der oberen linken Ecke befinden) und stellen Sie sicher, dass die Platte genau in den Rahmen passt. Schließen Sie die Ladeklappe.
- Klicken Sie auf “Start Run”, um die PCR zu beginnen.

Tabelle 13: Standard PCR-Programm für das LightCycler® 480 Instrument II.

Programm Parameter	Denaturierung	Zyklen			Abkühlung
Analyse Modus	None	Quantification Mode			None
Zyklen	1	50			1
Segment	1	**1**	**2**	**3**	1
Zieltemperatur [°C]	94	62	56	93	40
Dauer [hh:mm:ss]	00:20:00	00:00:05	00:00:35	00:00:30	00:00:30
Heizrate [°C/s]*	1.0	1.3	1.3	1.3	1.3
Detektionsmodus	keine	keine	einmalig	keine	keine

* LightCycler® 480 Instrument II: Wählen Sie das Detektionsformat “Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe“; aktivieren Sie die Filterkombination 465 - 510 nm und 533 - 580 nm und setzten Sie das “Reaction Volume“ auf „30“.

12.3. Ergebnisanalyse (LightCycler 480 Instrument II)

Hinweis: Führen Sie die Datenanalyse ausschließlich auf belegten Well-Positionen durch, indem Sie ein entsprechendes “sample sub set”, wie im Benutzerhandbuch des LightCycler® 480 Instruments II beschrieben, definieren.

- Klicken Sie auf “Analysis” in der LightCycler® 480 Basic Software, um das “Analysis Overview” Fenster zu öffnen.
- Wählen Sie “Abs Quant/Fit Points” für alle Proben aus.
- Aktivieren Sie die Filterkombination “Filter Comb 465 - 510“.

- Setzen Sie den ersten Zyklus “First Cycle” auf “1” und den letzten Zyklus “Last Cycle” auf “50”.
- Stellen Sie den Hintergrund auf “5 - 22” (klicken Sie auf den blauen “background” Knopf), indem Sie “Min Offset“ auf “4“ und “Max Offset“ auf “21“ im Fenster “Cycle Range” setzen.
- Stellen Sie die Hintergrundkompensation im “Noise Band”-Fenster auf “Noise Band (Fluoresc)“ und setzen Sie den Grenzwert auf “2.0“.
- Stellen Sie im “Analysis“-Fenster den “Threshold (Manual)” Grenzwert auf “2.0“.
- Stellen Sie im “Analysis“-Fenster die Anzahl der Fit Points auf “2“ ein.
- Drücken Sie auf “Calculate”.

Der **Septin9 Crossing Point (“CP”)** wird für jede Probe automatisch berechnet und in der Ergebnistabelle angezeigt.

- Exportieren Sie die CP-Werte durch Anklicken der Ergebnistabelle mit der rechten Maustaste. Wählen Sie “Export” aus. Speichern sie den Datensatz unter einem spezifischen, für Sie zweckmäßigen Namen.
- Wählen Sie “Filter Comb 533 - 580” aus.
- Setzen Sie “First Cycle“ auf “1“ und “Last Cycle“ auf “50“.
- Legen Sie den Hintergrund (nach Anklicken des blauen „Background“ Knopfes) auf “5 - 22” fest, indem Sie “Min Offset“ auf “4“ und “Max Offset“ auf “21“ im Fenster “Cycle Range“ setzen.
- Stellen Sie die Hintergrundkompensation im “Noise Band”-Fenster auf “Noise Band (Fluoresc)“ und setzen Sie den Grenzwert auf “2.0“.
- Stellen Sie im “Analysis“-Fenster den “Threshold (Manual)” Grenzwert auf “2.0“.
- Stellen Sie im “Analysis“-Fenster die Anzahl der Fit Points auf “2“ ein.
- Drücken Sie auf “Calculate”.

Die **ACTB CP-Werte** für jede Probe werden automatisch berechnet und in der Ergebnistabelle angezeigt.

- Exportieren Sie die CP-Werte durch Anklicken der Ergebnistabelle mit der rechten Maustaste. Wählen Sie “Export” aus. Speichern sie den Datensatz unter einem spezifischen, für Sie zweckmäßigen Namen.

Hinweis: Passen Sie den “Noise Band” und den “Threshold” so an, dass er kurz über dem Hintergrund liegt und dass die Amplifikationskurven am Anfang der Exponentiellen Phase der PCR geschnitten werden. Amplifikationskurven ohne signifikanten exponentiellen Anstieg sind als negativ zu werten.

12.4. **Validität der Epi proColon Kontrollen (LightCycler 480 Instrument II)**

Ein Lauf (ein oder mehrere Patientenproben, die zusammen mit einer Epi proColon Positive Control und einer Epi proColon Negative Control prozessiert werden) ist valide, wenn die Kriterien aus Tabelle 14 für **ALLE DREI (3)** PCR Replikate von jeder Kontrolle erfüllt sind.

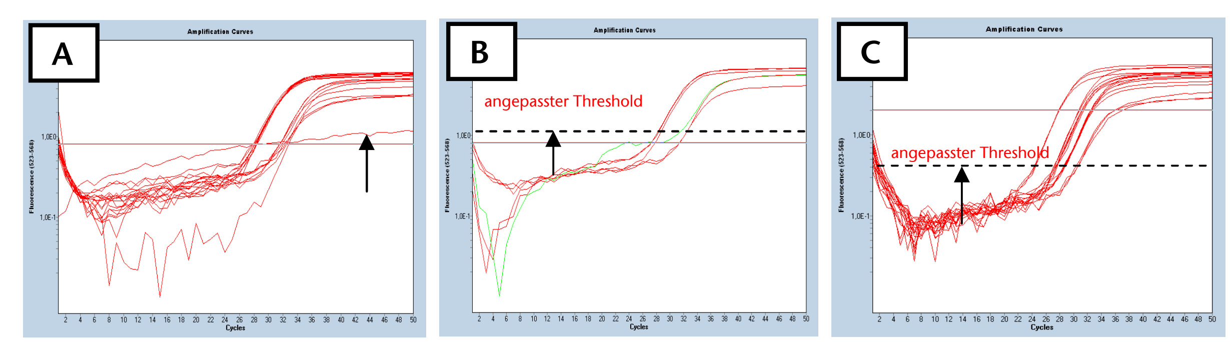


Abbildung 5: Screenshots einer Septin9 Amplifikationskurve auf einem LightCycler 480. A: Amplifikationskurven ohne signifikanten exponentiellen Anstieg sind als negativ zu werten. B: Passen Sie den “Noise Band” und den “Threshold” so an, dass er kurz über dem Hintergrund liegt. C: Passen Sie den “Noise Band” und den “Threshold” so an, dass die Amplifikationskurven am Anfang der Exponentiellen Phase der PCR geschnitten werden.

Wenn entweder die Epi proColon Positive Control oder die Epi proColon Negative Control (oder beide) invalide sind, können die Patientenproben, die zusammen mit den Kontrollen prozessiert wurden, nicht bewertet werden. Der Test muss für alle Proben in solch einem Lauf wiederholt werden.

Tabelle 14: Validitätskriterien für die Epi proColon Kontrollen (LightCycler 480 Instrument II).

Ergebnis der Kontrollen	Bestimmung	Septin9 Ergebnis	ACTB Ergebnis
Valide Epi proColon Positive Control	PCR1 PCR2 PCR3	CP* ≤ 40.5 CP* ≤ 40.5 CP* ≤ 40.5	CP* ≤ 30.3 CP* ≤ 30.3 CP* ≤ 30.3
Valide Epi proColon Negative Control	PCR1 PCR2 PCR3	kein CP* bestimmt	CP* ≤ 37.1 CP* ≤ 37.1 CP* ≤ 37.1

*Crossing Point (Schwellenwertzyklus)

12.5. Interpretation von Ergebnissen einzelner PCR-Reaktionen (LightCycler 480 Instrument II)

Die Interpretation einer einzelnen PCR erfolgt gemäß Tabelle 15. Wenn das Ergebnis der internen ACTB Kontrolle eine ausreichende DNA Menge in der Einzel-PCR ausweist (Wert für Schwellenwertzyklus von ACTB siehe Tabelle 15), bestimmt das Ergebnis der Septin9 PCR das Ergebnis der Einzel-PCR. Ein ACTB Wert oberhalb des in Tabelle 15 definierten Werts kennzeichnet eine “Invalide PCR”.

Tabelle 15: Interpretation der Einzel-PCR Ergebnisse (LightCycler 480 Instrument II).

Einzel-PCR Ergebnis	Septin9 Ergebnis	ACTB Ergebnis
Septin9 Positiv	CP* < 50	CP* ≤ 33.7
Septin9 Negativ	kein CP* bestimmt	CP* ≤ 33.7
Invalide	jedes Ergebnis	CP* > 33.7

*Crossing Point (Schwellenwertzyklus)

13. Beurteilung von Patientenproben

Das Testergebnis für einen Patienten wird anhand der Tabelle 16 bestimmt. Der Patient ist „POSITIV" getestet, wenn mindestens zwei der drei PCR Replikate Septin9 positiv sind. Der Patient ist „NEGATIV" getestet, wenn mindestens zwei der drei PCR Replikate Septin9 negativ sind. Das Testergebnis in allen anderen Fällen ist „INVALIDE".

Tabelle 16: Interpretation des Epi proColon 2.0 CE Test Ergebnisses.

Test Ergebnis	Positivkontrolle Negativkontrolle	Einzel-PCR Ergebnis
POSITIV	Valide	Mindestens zwei positive Septin9 PCR
NEGATIV	Valide	Mindestens zwei negative Septin9 PCR
INVALIDE	Valide	Alle anderen Fälle
INVALIDE	Invalide	Nicht zutreffend

14. Qualitätskontrolle

14.1. Externe Kontrollen

Der Epi proColon 2.0 CE Test enthält Epi proColon Positive Control und Epi proColon Negative Control (M5-02-003). Diese Kontrollen müssen in jedem Lauf eingesetzt werden, um die erfolgreiche Durchführung des Tests zu bestätigen, und die Validität der Ergebnisse sicherzustellen. Die Epi proColon Positiv Control und Negative Control müssen innerhalb ihrer spezifizierten Validitätsbereiche liegen (siehe Tabelle 8, oder Tabelle 11, oder Tabelle 14). Wenn eine Kontrolle außerhalb ihres Validitätsbereiches liegt, sind die dazugehörigen Testergebnisse invalide, dürfen nicht berichtet werden, und der Test muss wiederholt werden.

Wenn Ihre Laborqualitätsvorschriften einen häufigeren Einsatz von Kontrollen vorschreiben, folgen Sie diesen Anweisungen.

14.2. Interne Kontrollen

Die interne Kontrolle ermöglicht den Nachweis von Bisulfit-konvertierter ACTB (ß-Aktin) DNA. Diese gleichzeitig amplifizierte Kontrolle überprüft die Qualität der Probe, der Probenvorbereitung sowie eine ausreichende DNA-Menge der Probe.

Das Ergebnis der Septin9 PCR ist vom CP- oder CT-Wert der ACTB PCR abhängig (siehe Tabelle 9, oder Tabelle 12, oder Tabelle 15). CP- oder CT-Werte der ACTB PCR, die außerhalb des spezifizierten Bereichs liegen, führen zu einem invaliden Einzel-PCR Ergebnis. Zu hohe CP- oder CT-Werte der ACTB PCR weisen auf sehr niedrige bisDNA-Mengen oder Inhibition der PCR hin.

15. Grenzen des Verfahrens

- Nur für die *in vitro* Diagnostik geeignet.
- Dieses Produkt wurde ausschließlich als Kombination von Epi proColon Plasma Quick Kit (M5-02-001), Epi proColon Sensitive PCR Kit (M5-02-002), und Epi proColon Control Kit (M5-02-003) validiert. Die einzelnen Komponenten dürfen nicht durch alternative DNA-Extraktionsmethoden oder PCR Kits ersetzt werden.
- Dieses Produkt wurde für die Analyse von Plasma entwickelt. Es wurden ausschließlich die folgenden Blutentnahmeröhrchen validiert: BD Vacutainer® K_2EDTA, S-Monovette® 9 ml K3E und S-Monovette® 8.5 ml CPDA. Andere Arten von Patientenproben und andere Blutentnahmeröhrchen wurden nicht validiert.
- Die Lagerung von Blut in S-Monovette® 8.5 ml CPDA Röhrchen bei Temperaturen höher als 25°C kann zu einem falsch-positiven Ergebnis führen.
- Dieses Produkt darf nur von Personen mit Erfahrung und Training auf PCR Tests verwendet werden.
- Der Nachweis von Darmkrebs ist abhängig von der Menge an zirkulierender Tumor-DNA in der Blutprobe und kann durch die Blutentnahme, die Blutlagerung, den Zustand des Patienten (z.B. Alter, andere Erkrankungen) und das Tumorstadium beeinflusst werden.
- Das Testergebnis kann nicht zur endgültigen Bestätigung von Darmkrebs verwendet werden. Jedes positive Epi proColon 2.0 CE Testergebnis sollte durch eine Koloskopie oder Sigmoidoskopie bestätigt werden.
- Positive Testergebnisse wurden bei Patienten mit den folgenden Krankheiten beobachtet: chronische Gastritis, Ösophagitis, nicht-rheumatoide Arthritis, Lungenkrebs, Brustkrebs und Prostatakrebs.
- Positive Testergebnisse wurden bei schwangeren Frauen beobachtet.
- Das Septin9 Ergebnis muss im Zusammenhang mit anderen klinischen Parametern beurteilt werden.

16. Spezifische Leistungsdaten

16.1. Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde von drei Personen in jeweils vier unabhängigen Läufen mit jeweils 2 x 7 technischen LoD (Limit of Detection) Proben unterschiedlicher HeLa DNA Konzentrationen untersucht.

Untersucht wurden LoD Proben ohne HeLa DNA (0 pg/ml) und gespikte LoD Proben mit einer HeLa DNA Konzentration von 6, 12, 18, 25, 35 und 50 pg/ml. Alle 168 Septin9 Testergebnisse mit dem Applied Biosystems® 7500 Fast und der SDS v1.4 Software waren valide. 133 von 144 LoD Proben mit gespikter HeLa DNA waren positiv und 24 von 24 Proben ohne HeLa DNA waren negativ. Mittels logistischem Regressionsmodell ergab sich ein LoD_{95} von 14 pg/ml (95 % Konfidenzintervall (KI): 9 pg/ml - 19 pg/ml) für den Epi proColon 2.0 CE Test.

In einem analogen Experiment wurde die analytische Sensitivität für das LightCycler® 480 Instrument I bestimmt und ein vergleichbarer LoD_{95} wurde ermittelt.

16.2. Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse wurde durch wiederholtes Testen von neun humanen EDTA-Plasmapoolproben ermittelt. Sechs der Plasmapools wurden aus gemischtem humanem EDTA-Plasma von Patienten mit diagnostiziertem Darmkarzinom hergestellt. Weitere drei Kontroll-Pools enthielten humanes EDTA-Plasma von Individuen ohne offensichtliche Krankheitssymptome. Alle Plasmapools wurden in sechs Replikaten von drei Personen mit verschiedenen Chargen des Epi proColon Plasma Quick Kits (M5-02-001) und des Epi proColon Sensitive PCR Kits (M5-02-002) prozessiert. In 54 von 54

Septin9-Bestimmungen entsprachen die Ergebnisse genau den Erwartungen (Krebs-Pool: Septin9 positiv; Kontroll-Pool: Septin9 negativ).

16.3. Klinische Leistungsfähigkeit

Die klinische Leistungsfähigkeit des Epi proColon 2.0 CE Tests wurde mit 149 prospektiv gesammelten Proben von Patienten aus einer Screening-Population ohne entsprechende Krankheitssymptome und ohne Befund bei der Koloskopie und mit 197 Patientenproben einer Fall–Kontroll–Studie bestimmt. Die Studie enthielt Plasmaproben von Patienten mit histologisch bestätigtem Kolorektalkarzinom aller Stadien und Plasmaproben von Individuen, die keinen Befund bei einer Koloskopie aufwiesen und ohne entsprechende Krankheitssymptome waren.

Bisulfit-konvertierte DNA wurde aus Plasmaproben gewonnen. Das Plasma wurde innerhalb von vier Stunden nach der Blutentnahme mit Vacutainer® K_2EDTA Blutröhrchen (Becton Dickinson) gewonnen. Valide Septin9-Bestimmungen wurden in 346 von 346 Proben (100 %) erzielt.

In der prospektiv gesammelten Kohorte wurde 1 Patient von 149 positiv gemessen. Das entspricht einer Falsch-Positiv-Rate von 1 % (KI 95 %: 0 % - 4 %) in dieser Gruppe. Daraus ergibt sich eine klinische Spezifität von 99 % (KI 95 %: 96 % - 100 %).

Von den 99 Individuen der Fall–Kontroll–Studie ohne den Hinweis auf eine Erkrankung (Kontrollen) wurden 96 Proben Septin9 negativ gemessen. Dies entspricht einer klinischen Spezifität von 97 % (KI 95 %: 91 % - 99 %); siehe Tabelle 17.

Von den 98 Patienten mit diagnostiziertem Kolorektalkarzinom, wurden 79 Proben Septin9 positiv gemessen, was einer klinischen Sensitivität von 81 % entspricht (KI 95 %: 72 % - 87 %). Von den 56 Patienten mit Darmkrebs im Frühstadium wurden mit dem Epi proColon 2.0 CE Test 43 Patienten (18 Stadium I, 25 Stadium II) Septin9 positiv getestet (77 %).

Die folgende Tabelle fasst die Ergebnisse zusammen.

Tabelle 17: Zusammenfassung der Daten zur Leistungsfähigkeit des Epi proColon 2.0 CE Tests.

	Kontrollen (Screening Kohorte)	**Kontrollen (Fall-Kontroll)**	**Alle Darmkarzinome**	**Darmkarzinom Frühstadien**
Valide Ergebnisse	149	99	98	56
Septin9 positiv	1	3	79	43
Septin9 negativ	148	96	19	13
Positivrate	1 %	3 %	81 %	77 %

16.4. Konkordanz der beiden Real-Time PCR Instrumente

Die Konkordanz der Epi proColon 2.0 CE Testergebnisse erzielt mit dem LightCycler® 480 Instrument I und dem Applied Biosystems® 7500 Fast Dx System wurde durch paralleles Testen von 48 klinischen Plasmaproben von Patienten mit histologisch bestätigtem Darmkarzinom in allen Krankheitsstadien und 52 Individuen ohne bekannte Darmerkrankung untersucht. In 93 % (93/100) der Fälle wurden mit beiden Geräten übereinstimmende Septin9-Ergebnisse erzielt.

16.5. Interferenz

Es wurde keine Interferenz mit den Kontrollen, positiven und negativen Proben beobachtet, wenn erhöhte Konzentrationen folgender Substanzen zugefügt wurden: unmethylierte genomische DNA (100 ng/ml), Bilirubin (0,20 mg/ml), Hämoglobin (1 mg/ml), Triglyzeride (12 mg/ml), Protein (humanes

Serumalbumin) (120 mg/ml), rote Blutzellen (0.4% v/v), K_2EDTA (20 mg/ml), Cholesterin (5 mg/ml), Harnstoff (0,235 mg/ml) und Glukose (10 mg/ml).

17. Bedeutung der Symbole

Symbol	Bedeutung
	Bitte Gebrauchsanleitung beachten
REF	Artikelnummer
IVD	Für die diagnostische *in vitro* Untersuchung
LOT	Chargennummer
	Verfallsdatum
	Hersteller
	Lagertemperatur
Σ	Inhalt ausreichend für x Tests
	Nicht wiederverwendbar

18. Referenzen

1. deVos, T et al. Circulating methylated SEPT9 DNA in plasma is a biomarker for colorectal cancer. Clinical Chemistry 55:7, 1337-46 (2009)
2. Lofton-Day, C. et al. DNA methylation biomarkers for blood-based colorectal cancer screening. Clinical Chemistry 54:2, 414-423 (2008)
3. Model, F. et al. Identification and validation of colorectal neoplasia-specific methylation markers for accurate classification of disease. Mol Cancer Res 5, 153-163 (2007)
4. Eads, C.A. et al. MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation. Nucleic Acids Research, Volume 28, Issue 8, e32 (2000)

19. Kontaktinformationen

Epi proColon 2.0 CE wird hergestellt von:

Epigenomics AG

Geneststr. 5

10829 Berlin, Germany

Für weitere Informationen und Hilfestellungen senden Sie bitte eine Email oder rufen Sie an:

support@products.epigenomics.com

Phone: +49 30 24345 222

Fax: +49 30 24345 555

Informationen für den Käufer:

Epi proColon (Epi proColon®) ist ein eingetragenes Warenzeichen der Epigenomics AG. Alle anderen, in diesem Dokument genannten Warenzeichen, Marken und Namen sind Eigentum der jeweiligen Firmen.

LightCycler® 480 System ist ein eingetragenes Warenzeichen der F. Hoffmann-La Roche Ltd.
Applied Biosystems®, MicroAmp® sind eingetragene Warenzeichen der Life Technologies Corporation; DynaMag™ ist ein Warenzeichen der Life Technologies Corporation.
BD Vacutainer® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Becton Dickinson Inc./Corporation.
S-Monovette® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Sarstedt AG & Co.
ThermoMixer®, Research®, Reference®, Multipette®, ep Dualfilter T.I.P.S.®, Combitips advanced® sind eingetragene Warenzeichen der Eppendorf AG; Safe-Lock Gefäße™ ist ein Warenzeichen der Eppendorf AG.
HandyStep® ist ein eingetragenes Warenzeichen der Brand GmbH + Co KG.

Dem Käufer werden mit Erwerb des Produktes Rechte zur Benutzung bestimmter Roche-Patente eingeräumt, die jedoch ausschließlich zur Bereitstellung von Diensten im Bereich der In-Vitro Diagnostik beim Menschen zu verwenden sind. Eine allgemeine Patent- oder sonstige Lizenz, welche über vorgenanntes Nutzungsrecht des Käufers hinausgeht, wird nicht eingeräumt.